

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. November 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/72007 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: G01N 33/487,
21/35

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ROBERT-KOCH-INSTITUT [DE/DE]; Nordufer
30, D-13353 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01404

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. Mai 2000 (03.05.2000)

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NAUMANN, Dieter
[DE/DE]; Mariannenplatz 22, D-10997 Berlin (DE).
KNEIPP, Janina [DE/DE]; Schamweberstrasse 44,
D-10247 Berlin (DE). BALDAUF, Elizabeth [DE/DE];
Bahnhofstrasse 45 C, D-14624 Dallgow (DE). LASCH,
Peter [DE/DE]; Müggelstrasse 24, D-10247 Berlin (DE).
BEEKES, Michael [DE/DE]; Bahnhofstrasse 45 C,
D-14624 Dallgow (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

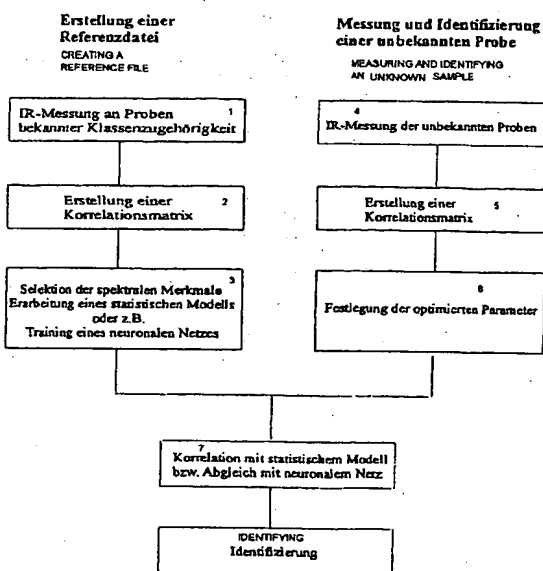
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 23 811.1 20. Mai 1999 (20.05.1999) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING TSE-INDUCED CHANGES IN TISSUES USING INFRARED SPECTROSCOPY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSE TSE-INDUZIERTER VERÄNDERUNGEN IN GEWEBEN MITTELS IN-
FRAROTSPEKTROSKOPIE



1. INFRARED MEASURING ON SAMPLES OF KNOWN CLASS ASSOCIATION
2. CREATING A CORRELATION MATRIX
3. SELECTING THE SPECTRAL CHARACTERISTICS COMPARING A STATISTICAL MODEL OR, FOR EXAMPLE, TRAINING A NEURONAL NETWORK
4. INFRARED MEASURING OF THE UNKNOWN SAMPLES
5. CREATING A CORRELATION MATRIX
6. DETERMINING THE OPTIMIZED PARAMETERS
7. CORRELATING WITH THE STATISTICAL MODEL OR ALIGNING WITH THE NEURONAL NETWORK

(57) Abstract: The aim of the invention is to quickly diagnose TSE-induced changes in animal and human tissues by measuring infrared spectra of these tissues. Either thin slices of tissue, pieces of tissue or tissue homogenizates serve as tissue samples. The measurements of the infrared spectra are carried out in a known experimental device that is used in infrared spectroscopy (e.g. in transmission, attenuated total reflection, direct or diffuse reflection). The detection of the pathological changes induced by TSE is carried out by comparing the infrared spectra of the sample to be examined with a reference data bank consisting of infrared spectra that were obtained from healthy material or from pathologically changed tissue samples. The conformation of the spectra of unknown samples with the reference data bank is preferably carried out using pattern recognition techniques (e.g. multivariate statistical models, artificial neuronal networks, genetic algorithms).

(57) Zusammenfassung: Zur schnellen Diagnose TSE-induzierter Veränderungen in tierischen und menschlichen Geweben werden Infrarotspektren dieser Gewebe gemessen. Als Gewebeprobe dienen entweder Gewebedünnschnitte, Gewebestücke oder Gewebehomogenisate. Die Messungen der Infrarotspektren erfolgen in einer an sich bekannten experimentellen Anordnung der IR-Spektroskopie (z.B. in Transmission, abgeschwächter Totalreflexion, direkter oder diffuser Reflexion). Der Nachweis der durch TSE hervorgerufenen pathologischen Veränderungen erfolgt dann

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/72007 A2

Best Available Copy



(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48,
D-14129 Berlin (DE).

FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AU, BA,
BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD,
GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG,
SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

über einen Vergleich der Infrarotspektren der zu untersuchenden Probe mit einer Referenzdatenbank, bestehend aus Infrarotspek-
tren, die von gesundem Material bzw. von pathologisch veränderten Gewebeproben erhalten wurden. Der Abgleich der Spektren
unbekannter Proben mit der Referenzdatenbank erfolgt bevorzugt mittels Mustererkennungstechniken (z.B. multivariater statistis-
cher Modelle, künstlicher neuronaler Netze, genetischer Algorithmen).

5 Verfahren zur Diagnose TSE-induzierter Veränderungen in Geweben mittels Infrarotspektroskopie.

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die schnelle Identifizierung von durch transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) induzierte pathologische Veränderungen in tierischen oder menschlichen Geweben mit Infrarotspektroskopie (IR-Spektroskopie).

15 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien sind übertragbare neurodegenerative Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) mit tödlichem Verlauf, die viele Säugetiere sowie auch den Menschen betreffen können. Hierbei gilt TSE als ein Überbegriff, unter dem die bei verschiedenen Spezies auftretenden Krankheitsformen zusammengefaßt werden. Neben der Scrapie (Traberkrankheit), der ursprünglich bei Schafen aufgetretenen, aber auf Hamster und Mäuse übertragbaren Form, sind bislang fünf weitere TSE in 20 Säugetieren bekannt: Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind, die chronische Auszehrung (CWD) bei bestimmten amerikanischen Hirscharten, die übertragbare Enzephalopathie (TME) bei Nerzen, die feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Katzen und eine spongiforme Enzephalopathie bei Antilopen. Beim Menschen unterscheidet man vier TSE: Die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (CJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die familiäre fatale Insomnie (FFI) und Kuru.

30 Definitiv läßt sich eine TSE a) durch den histologischen Nachweis charakteristischer spongiformer (schwammartiger), mit einer Gliose einhergehender Veränderungen im Hirngewebe, b) durch den immunologischen Nachweis von Ablagerungen des pathologischen Prionpro-

teins (PrP) mittels Western-Blot-Technik, Histo-Blot-Technik und Immunohistochemie, c) durch den elektronenmikroskopischen Nachweis Scrapie-assoziiierter (PrP-)Fibrillen (SAF) und d) durch den Nachweis des infektiösen TSE-Agens mittels Übertragungsexperimenten im Tierversuch diagnostizieren.

Klinische Symptome und der laborchemische Nachweis erhöhter Konzentrationen bestimmter Proteine in Liquor und/oder Serum [Protein 14-3-3 (Zerr et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336: 874; Zerr et al. (1998) *Ann. Neurol.* 43: 32-40.), Protein S100 (Otto et al. (1997) *J. Neurol.* 244: 566-570; Otto et al. (1998) *Brit. Med. J.* 316: 577-582; Otto et al. (1998) *J. Neurovirol.* 4: 572-573) und neuronspezifische Enolase (Zerr et al. (1995) *Lancet* 345: 1609-1610)] erlauben bei Mensch und Tier lediglich eine Verdachtsdiagnose. Gleiches gilt für EEG- oder magnetresonanztomografische Veränderungen, die im Zusammenhang mit menschlichen TSE auftreten.

Mit der Weiter- und Neuentwicklung von Nachweisverfahren für TSE werden u.a. folgende Ziele verfolgt:

- a) Die Verbesserung der Differentialdiagnostik humaner TSE. Diese Krankheiten lassen sich bisher nur post mortem oder durch Hirnbiopsie mit Gewißheit diagnostizieren.
- b) Die Erkennung von TSE-Kontaminationen in Blut, Organen und Geweben sowie in daraus gewonnenen Produkten menschlichen und tierischen Ursprungs.
- c) Die Erkennung menschlicher TSE-infizierter Blut-, Organ- und Gewebespende.
- d) Die Erkennung TSE-infizierter Nutztiere (z.B. Rinder und Schafe) im präklinischen oder klinischen Stadium am Schlachthof bzw. im Feld.

Die Diagnostik von TSE-Erkrankungen bei Nutztieren ist wegen der potentiellen Übertragbarkeit durch den Verzehr von Fleisch erkrankter Tiere von großem Interesse. So besteht z.B. der Verdacht, daß der Konsum von BSE-

- verseuchtem Rindfleisch eine neue Variante von CJD beim Menschen (nvCJD) verursachen kann. Im Sinne des Verbraucherschutzes und der Eindämmung der Ausbreitung der Epidemie führen daher zur Zeit einige Staaten behördliche Überwachungen des Durchseuchungsgrades von Rinderpopulationen mit BSE ein. In diesem Zusammenhang werden auf Schlachthöfen routinemäßige Kontrollen geschlachteter Rinder angestrebt, von denen die weitere Verwertbarkeit des Schlachtgutes abhängt.
- 10 Zur Zeit befinden sich verschiedene Testsysteme in der Entwicklung, um ein sensitives und schnelles Screening großer Probenzahlen auf pathologisches Prionprotein und somit eine TSE-Diagnostik im großtechnischen Maßstab zu ermöglichen. Dazu zählen u.a. ein Kapillarelektrophorese-Immunoassay mit fluoreszenzmarkierten Peptiden (Schmerr & Jenny (1998) *Electrophoresis* 19: 409-419) und ein Delfia
- 15 genanntes immunologisches Detektionssystem mit fluoreszierenden Lanthanidchelaten (Safar et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 1157-1165).
- 20 Bisher ist nur ein diagnostisches Verfahren zur Identifizierung von TSE-infizierten Nutztieren in großtechnischem Maßstab verfügbar. Dieses ist auf die Anwendung im Schlachthof begrenzt und erlaubt die Feststellung einer BSE im Rind nach Angaben des Entwicklers bis zu einem
- 25 halben Jahr vor dem Auftreten klinischer Symptome (Information des Herstellers im Internet: <http://www.prionics.ch>).
- Bei diesem von der Schweizer Firma *Prionics AG* entwickelten Verfahren wird die Gewebeprobe aus der Medulla oblongata geschlachteter Rinder homogenisiert und mit dem Enzym Proteinase K behandelt. Das ggf. nach der Behandlung verbleibende pathologische Prionprotein wird mit dem
- 30 monoklonalen Antikörper 6H4 (hergestellt von der Firma *Prionics*) markiert und anschließend im Western-Blot angefärbt. Vom Zeitpunkt der Gewinnung der Probe bis zum Er-
- 35

halt eines endgültigen Ergebnisses vergehen bei diesem Verfahren nach Angaben des Herstellers bis zu 12 Stunden.

5 Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum schnellen, zuverlässigen und ökonomischen Nachweis TSE-induzierter Veränderungen in Geweben zu entwickeln. Das erfindungsgemäße Verfahren soll auch unter den Bedingungen eines Schlachthofes im Routinebetrieb effektiv einsetzbar sein.

10 Aufgabe der Erfindung ist somit die Schaffung eines Verfahrens zur Diagnose von TSE-induzierten pathologischen Veränderungen in Geweben, wobei die Veränderungen durch Scrapie, BSE oder durch eine andere dem TSE-Formenkreis
15 zugehörigen Krankheitsform hervorgerufen werden.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß
(a) Infrarotstrahlung auf eine durch TSE pathologisch
veränderte Gewebeprobe gelenkt wird und die spektralen
20 Charakteristika der Infrarotstrahlung nach Wechselwirkung mit der Probe registriert werden und
(b) die so erhaltenen Infrarotspektren mit einer Referenzdatenbank, welche Infrarotspektren von TSE-
infizierten Geweben und von nicht-infizierten Geweben
25 enthält, verglichen und klassifiziert werden.

Ausgestaltungen der Erfindung werden in den Unteransprüchen beschrieben.

Das der Erfindung zugrunde liegende Verfahren basiert wesentlich auf Messungen der Infrarotspektren des pathologisch veränderten Gewebes. Bekannt ist bereits durch eine
30 Reihe von Publikationen und Patentanmeldungen, daß krankheitsspezifische Veränderungen sich im Infrarotspektrum der Gewebe widerspiegeln können (US Patent 5,168,162

(Wong & Rigas; US Patent 5,038,039; Wong, Rigas; Lasch & Naumann (1998) *Cell. Mol. Biol.* 44: 189-202; Lasch et al. (1998) *Proc. SPIE* 3257: 187-198; Choo et.al. (1996) *Biophys. J.* 71: 1672-1679). Über Infrarotspektroskopie an TSE-Gewebeproben liegen allerdings bislang keine publizierten Daten vor.

Die experimentellen Daten, die der vorliegenden Patentbeschreibung zugrunde liegen, wurden anhand von ZNS-Proben Scrapie-infizierter Hamster als Modellsystem entwickelt. Es wurde im Hamstermodell festgestellt, daß nach Infektion der Tiere mit Scrapie charakteristische Änderungen im Infrarotspektrum von Gewebeproben des ZNS auftreten. Diese Änderungen konnten nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durch Vergleich mit entsprechenden Proben von nicht-infizierten, also gesunden Tieren identifiziert werden. Das Verfahren ist prinzipiell für die Diagnose jeder der Krankheitsbilder des TSE-Formenkreises anwendbar.

Verfahrensgemäß ist für die TSE-Diagnostik mittels Infrarotspektroskopie ein Vergleich von Spektren des zu untersuchenden Gewebematerials mit entsprechenden Spektren von Geweben bekannten Ursprungs im Sinne eines Referenzverfahrens notwendig. Die praktische Durchführung des Verfahrens erfordert daher das Vorliegen einer validierten Referenzdatenbank von IR-Spektren, die von gesunden bzw. pathologischen Gewebeproben erhalten wurden. Die Erstellung der Referenzdatenbank ist für eine standardisierte Diagnostik nur einmal erforderlich.

Der Abgleich von Spektren unbekannter Proben mit der Referenzdatenbank erfolgt dann vorzugsweise mittels Techniken der computergestützten Mustererkennungsverfahren, wie z.B. multivariate Statistik, künstliche neuronale Netze, genetische Algorithmen etc..

Zum Erfassen der Spektren wird auf die Proben Infrarotlicht gelenkt und die spektralen Charakteristika der aus tretenden Strahlung, d.h. nach Wechselwirkung des Lichts

mit dem Gewebe registriert. Vorteilhaft ist der Einsatz
mikrospektrometrischer Techniken, wenn eine Minimierung
der erforderlichen Probenmengen angestrebt wird. Beim
Einsatz eines Infrarotmikroskops können darüber hinaus an
5 Dünnschnitten auch orts aufgelöst spektrale Informationen
gewonnen werden, die das Verfahren wesentlich spezifi-
scher und empfindlicher gestalten können. In der Perspek-
tive wäre ein Nachweis mittels Infrarotlichtleiter als
Endoskop denkbar, der die Diagnostik von TSE direkt im
10 infizierten Organismus ermöglicht.

Zum besseren Verständnis ist der typische Ablauf des Ver-
fahrens in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Insgesamt erlaubt das neue Verfahren zur Diagnose TSE-
15 induzierter Veränderungen in Gewebe Aussagen innerhalb
weniger als einer Minute nach Erhalt der Probe. Damit ist
es sowohl dem immunologischen Nachweis des Prionproteins
und auch der immun-histologischen Diagnose überlegen, die
erst nach bis zu 12 Stunden ein Ergebnis liefern. Eine
20 routinemäßige Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens,
etwa zur Fleischkontrolle in Schlachthöfen, erfordert da-
her praktisch keinerlei Zwischenlagerung des Schlachtgu-
tes bis zum Erhalt der Diagnose. Die Schnelligkeit der
Diagnose stellt einen ökonomischen Vorteil gegenüber be-
25 kannten Verfahren dar, da Lagerungszeit des Schlachtgutes
und damit Raum- und Energiekosten für die Kühlung mini-
miert werden. Zusätzlich wird eine größere Frische des
Fleisches zum Zeitpunkt des Endverbrauchs erzielt.

Das Verfahren läßt sich sehr gut in einen Routineprozeß
30 integrieren, da Spektrenaufnahme, Spektrenverarbeitung
und die Klassifizierung vollständig computergesteuert er-
folgen und sich sehr leicht automatisieren lassen. Ein
geringer Personalbedarf besteht infolge dessen lediglich
für die an sich einfache Probenvorbereitung, die im Ge-
35 gensatz zu anderen Verfahren keine aufwendige Probenvor-

behandlung (z.B. Anreicherung des Prionproteins mittels PK-Verdau), kein Nachweisagens (z.B. Immunolabel) und keine Anfärbung der Gewebedünnschnitte (z.B. mittels Immunohistochemie) erfordert.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann ohne Einbeziehung hochspezialisierte Fachleute (etwa von Histologen) durchgeführt werden, da die Klassifizierung der IR-Spektren durch an sich bekannte, für die Zwecke der TSE-Diagnostik optimierte Verfahren der computergestützten
- 10 Mustererkennung erfolgt. Die Bewertung der Spektren anhand streng mathematischer Kriterien führt gleichzeitig zu einer hohen Sicherheit der Diagnose, die ohne subjektives Erfahrungswissen auskommt und somit unvermeidbare, menschliche Fehleinschätzungen umgeht.

- 15 Aufgrund des geringen Personalbedarfs und praktisch keiner laufenden Materialkosten stellt das erfindungsgemäße Verfahren ein wirtschaftlich sinnvolles Konzept dar.

- Der Vorzug des erfindungsgemäßen Verfahrens in seiner besonderen IR-mikroskopischen Ausführung zur orts aufgelösten Analyse von Gewebedünnschnitten liegt in der Kombination spezifischer, spektral aufgelöster Strukturinformation und der hohen Ortsauflösung, die hieraus erzielt wird. So kann mittels der erreichbaren Ortsauflösung eines IR-Mikroskopes die Beteiligung einzelner Neuronen am
- 20 Krankheitsverlauf erfaßt und untersucht werden. Die sehr hohe diagnostische Empfindlichkeit resultiert aus der Tatsache, daß praktisch keine Mittelung von Merkmalen kranker und gesunder Zellen erfolgt, wie es bei anderen, nicht-orts aufgelösten Methoden zwangsläufig der Fall ist.
- 25 Diese besondere Ausführungsform des Verfahrens erfordert derweil noch relativ viel Zeit für die Datenakquisition, welche in Abhängigkeit der Größe des untersuchten Gewebearials und der Ortsauflösung 1 bis 6 Stunden dauert, und eignet sich daher weniger für routinemäßige Kontrollen.
- 30 Sie dürfte jedoch eine breite Anwendung in der wissen-
- 35

schaftlich klinischen Erforschung der bislang unverstandenen Pathogenesemechanismen von TSE finden. Perspektivisch wird die Kombination dieser Ausführungsform mit sogenannten Array-Infrarotdetektoren, die zur Zeit von verschiedenen Herstellern entwickelt werden und mit denen
5 die orts aufgelöste Messung von IR-Spektren kompletter Areale von Gewebedünnschnitten innerhalb sehr kurzer Zeit möglich ist, das Verfahren auch der schnellen Routinediagnostik zugänglich werden.

10

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Gewebeproben dem Organismus *post mortem* entnommen. Dabei kann es sich sowohl um tierische als auch menschliche Organismen handeln.

15

Das Verfahren ist prinzipiell für die Diagnose jeder der speziellen Krankheitsformen geeignet, die unter dem Begriff transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) zusammengefaßt werden, wie z.B. BSE, Scrapie oder CJD.

20

Als Entnahmeort der Gewebeproben kommen alle Organe in Betracht, die durch eine TSE hervorgerufene pathologische Veränderungen aufweisen. Nach heutigem Wissensstand betroffene Organe sind das Zentrale Nervensystem, das periphere Nervensystem, Organe des lymphatischen Systems, des Verdauungssystems, des endokrinen Systems, des kardiovaskulären Systems und des respiratorischen Systems.

25

Bevorzugte Entnahmeorte sind das Zentrale Nervensystem und das periphere Nervensystem, wobei insbesondere Medulla oblongata sowie Pons des Hirns vorteilhaft sind.

30

Die Präparation der Gewebeprobe richtet sich nach der besonderen Ausführungsform des Verfahrens.

Für die Analyse voll hydratisierter Gewebeproben werden kleine Gewebestücke entnommen. Die nativen Proben werden z.B. in handelsüblichen IR-Küvetten plaziert.

Alternativ wird ein Homogenisat des Gewebematerials in H_2O hergestellt und Aliquote in IR-Küvetten gebracht. In Abwandlung werden Aliquote dieser Suspension als transparente Filme auf IR-durchlässigen Probenhaltern aufgetrocknet, wobei reduzierte Drücke sich als vorteilhaft im Sinne einer Beschleunigung des Antrocknungsvorganges erwiesen haben (Helm et al. (1991) J. Gen. Microbiol. 137:69-79.

Für die spezielle Durchführung des Verfahrens in einer infrarotmikroskopischen Meßanordnung zur Erfassung ortsspezifischer Informationen werden Krydünnschnitte, z.B. sagittale Schnitte präparierter Hirne angefertigt. Diese werden plan auf IR-transparente Objektträger aufgebracht. Das Verfahren erfordert keine weitere Fixierung des Dünnschnittes und die Proben werden bis zur Messung in trockener Umgebung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, bei der Infrarotlichtleiter eingesetzt werden, läßt sich das Verfahren prinzipiell auch am lebenden Organismus anwenden, indem der Lichtleiter minimalinvasiv in das Gewebe eingeführt und dort das Infrarotspektrum direkt erfaßt wird. Die Realisierung dieser Ausführungsform ist zur Zeit noch an die Weiterentwicklung der Infrarotlichtleitertechnologie gebunden, da die derzeit verfügbaren Lichtleiter noch zu geringe spektrale Empfindlichkeiten aufweisen und zudem noch zu unflexibel und zu groß sind.

Als Material für Küvetten bzw. Probenträger der oben beschriebenen Präparationsvarianten können prinzipiell alle in der IR-Spektroskopie üblicherweise verwendeten wasserunlöslichen optischen Materialien eingesetzt werden, wobei sich CaF_2 und BaF_2 besonders bewährt haben.

Die für die Aufnahme der IR-Spektren benötigten Substanzmengen und ihre flächenmäßige Ausdehnung können sehr klein gehalten werden. Je nach vorgegebenen Bedingungen (z.B. Spektroskopieren mit oder ohne Strahlfokussierung

bzw. Verwendung eines IR-Mikroskops) können Substanzmengen im Bereich von μg bis ng eingesetzt werden. Die Durchmesser der durchstrahlten Probenareale variieren dementsprechend zwischen 1-3 mm und 10-30 μm . Die Unter-
5 grenze entspricht etwa der Größe einer bzw. weniger Zellen (z.B. Neuronen).

Verfahrensgemäß werden Infrarotspektren der Gewebeproben gemessen, die in einer der beschriebenen Weise hergestellt wurden. Die Aufnahme der Spektren erfolgt hierbei
10 vorzugsweise mit einem Fourier-Transform-Infrarotspektrometer, welches gegenüber konventionell arbeitenden, dispersen Geräten eine Reihe von bekannten Vorteilen aufweist, von denen hier nur die Schnelligkeit der Datenaufnahme und die höhere Empfindlichkeit genannt werden sol-
15 len. Die Verwendung eines konventionellen, dispersen IR-Spektrometers ist grundsätzlich auch möglich, führt jedoch zu einem Verlust an Schnelligkeit des Verfahrens.

Prinzipiell kann für die Spektrenmessung jede der an sich bekannten IR-spektroskopischen Meßanordnungen eingesetzt
20 werden (z.B. in Transmission/Absorption, abgeschwächter Totalreflexion, direkter oder diffuser Reflexion). Besonders bewährt hat sich die Transmissions/Absorptions-spektroskopie.

Die Aufnahme des Infrarotspektrums erfolgt typischerweise
25 im Spektralbereich des sogenannten mittleren Infrarots zwischen 500 und 4000 cm^{-1} . Engere Spektralbereiche auch im nahen Infrarot zwischen 4000 und 10000 cm^{-1} führen ebenfalls zu einer erfolgreichen Diagnose, wenn zuvor sichergestellt wurde, daß die Spektren der infizierten und
30 der gesunden Gewebeproben charakteristische Varianzen im erfaßten Spektralbereich aufweisen. Es hat sich insbesondere erwiesen, daß besonders markante spektrale Unterschiede zwischen TSE-infizierten und nicht-infizierten Geweben zwischen 1000 und 1300 cm^{-1} detektiert werden

können und daß sich dieser Bereich daher bevorzugt für die Diagnose eignet.

Die Auswahl eines oder mehrerer geeigneter Spektralbereiche kann z.B. durch visuelle Inspektion der Spektren
5 (Auswahl der Bereiche mit den stärksten und charakteristischsten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe) oder durch ein an sich bekanntes multivariates Verfahren zur Selektion spektraler Merkmale erfolgen.

Die physikalischen Meßparameter, wie spektrale Auflösung
10 oder Anzahl der gemittelten Spektren etc., können innerhalb der in der IR-Spektroskopie üblichen Bereiche variiert werden, ohne sich in der Praxis als kritisch für den Erfolg der Klassifizierung bzw. der Diagnose zu erweisen. Wichtig bei der Festlegung der Parameter der Spektrenge-
15 winnung sowie der Probenpräparation ist lediglich, daß für alle Messungen, insbesondere auch für die Kontrollmessungen an Gewebeproben nicht infizierter Tiere, identische Parameter gewählt werden.

Unabhängig von der Wahl des mathematisch-statistischen
20 Verfahrens, das für die Klassifizierung der Spektren herangezogen wird, hat sich die Unterziehung der Spektren einer vorherigen Aufbereitung als vorteilhaft erwiesen. In Frage kommende, an sich bekannte Methoden sind etwa Berechnung der ersten oder zweiten Ableitung, Spektren-
25 Dekonvolution oder anderen Verfahren zur Erhöhung des spektralen Kontrastes, die eine Bandenerkennung erleichtern und eine Minimierung etwaig vorliegender Basislinienprobleme gestatten. Bei Vorliegen großer Probenzahlen hat sich überdies eine vorhergehende Datenreduktion
30 durch Methoden der multivariaten Statistik wie z.B. der Faktoranalyse als hilfreich erwiesen.

Die Durchführung des Verfahrens erfordert eine einmalige
Erstellung einer Referenzspektrendatenbank. Hierfür werden
Spektren von Proben aus TSE-infizierten Organismen
35 und solche von Proben aus TSE-freien Individuen gemessen.

Probenpräparation und Spektrenaufnahme werden hierfür in analoger Weise wie bei den unbekannten Proben durchgeführt. Entscheidend ist, daß alle Parameter für die Referenz- und Probenmessungen identisch gewählt werden.

5 Das Spektrum der zu untersuchenden Probe wird mit den Spektren der Referenzdatenbank verglichen. Dabei erfolgt die Klassifizierung des Spektrums vorzugsweise mithilfe eines der an sich bekannten Verfahren zur Mustererkennung, beispielsweise mit Algorithmen der multivariaten
10 Statistik, künstlichen neuronalen Netzen oder genetischen Algorithmen. In diesem Schritt wird das Spektrum im Sinne eines Zwei-Klassen-Problems als gesund oder TSE-infiziert klassifiziert.

Für die orts aufgelöste Durchführungsform des Verfahrens
15 wird die Probe, die in diesem Fall ein auf einen Objektträger aufgebrachter Gewebedünnschnitt ist, in den Strahlengang eines Infrarotmikroskops gebracht. Die Spektrenaufnahme in der infrarotmikroskopischen Meßanordnung kann wahlweise in Transmission oder in direkter Reflexion erfolgen. Es werden Infrarotspektren an verschiedenen Gewe-
20 bestellen aufgenommen. Die hierbei erreichte Ortsauflösung kann durch den Schrittabstand der einzelnen Meßpunkte bestimmt werden. Äußerst vorteilhaft ist der Einsatz eines Computer-gesteuerten x/y-Tisches, der automatisier-
25 te Spektrenmessungen gemäß eines beliebig bestimmbar Rasters mit definierten Schrittabständen ermöglicht. Derartige x/y-Tische gehören heute zur Standardausstattung moderner IR-Mikroskope.

Ergebnis einer orts aufgelösten Messung (Mapping) ist eine
30 Infrarotspektrenserie, wobei jedes Spektrum einen Pixel auf dem fiktiven Raster des Gewebedünnschnitts repräsentiert. Auf diese Weise werden IR-Daten erhalten, die den gewählten Ausschnitt des Dünnschnittes vollständig abdecken. Die ortsspezifische Information über die räumliche
35 Ausbreitung der TSE im Gewebe wird erhalten, indem jedes

der Spektren eines Mapping-Datensatzes mit der Referenzdatenbank abgeglichen wird und so entweder als gesund oder infiziert klassifiziert wird.

- 5 Das folgenden Beispiele sollen verdeutlichen, wie ZNS-Proben Scrapie-infizierter Hamster von denen gesunder Kontrolltiere gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand der krankheitsspezifischen spektralen Änderungen ihrer Infrarotspektren differenziert werden können.

10

Beispiel 1

- Erwachsene weibliche Syrische Hamster (*Mesocricetus auratus*) wurden mit dem Scrapie Stamm 263K (zur Verfügung gestellt von Dr. Richard Kimberlin) intracerebral und intraperitoneal infiziert. Im terminalen Stadium der Krankheit (70-120 Tage nach Infektion) wurden die Gehirne dieser Tiere (S) und von entsprechenden, nicht-infizierten Kontrolltieren (N) *post mortem* entnommen, wobei korrespondierende Vergleichspaare von gleichem Alter waren.
- 15 Für die Analyse der vollhydratisierten Gewebeproben wurden kleine Stücke (μg -Mengen) der nativ herauspräparierten *Medulla oblongata* und *Pons* in eine FT-IR Küvette gegeben, die mit CaF_2 -Fenstern und einer optischen Weglänge von 8 μm Schichtdicke ausgerüstet war. Die Infrarotspektren dieser Proben wurden in einem FT-IR Spektrometer in Transmission/Absorption gemessen (spektrale Auflösung: 4 cm^{-1} , Apodisation: Happ-Genzel, Zahl der Scans: 128, Zerofilling: 4). Zwei typische Spektren von S- und N-Gewebeproben sind in der Figur 2 im Spektralbereich zwischen 1300 und 1000 cm^{-1} dargestellt, in dem besonders prominente Unterschiede beobachtet werden können. Zur besseren Visualisierung der Banden sind die zweiten Ableitungen dargestellt, so daß Bandenmaxima als Minima erscheinen.
- 20
- 25
- 30

Beispiel 2

In Abwandlung der in Beispiel 1 dargelegten Ausführungsform wurden jeweils 10 S- und N-Proben, die auf gleiche Weise wie in Beispiel 1 erhalten wurden, in H₂O homogenisiert (10 µl H₂O pro mg Gewebematerial). Aliquote von 35 µl der Suspensionen wurden auf einen PC-gesteuerten Multiprobenträger, der auch zum Messen von mikrobiellen Proben geeignet ist (Helm et al. (1991) *J. Gen. Microbiol.* 137: 69-79; Helm et al. (1991) *J. Microbiol. Meth.* 14:127-142; Naumann (1998) *Proc. SPIE* 3257: 245-257), aus ZnSe aufgebracht und nach den in der Literatur beschriebenen Angaben angetrocknet. Infrarotspektren der so erhaltenen Filme wurden in Transmission aufgenommen und einer hierarchischen Klassifizierung unterzogen, wobei zweite Ableitungen der Spektren im Spektralbereich zwischen 1100 und 1000 cm⁻¹ zugrunde gelegt wurden. Das nach dem sogenannten Ward's Algorithmus berechnete Dendrogramm der Klassifizierung dieser Spektren zeigt die Figur 3. Die Spektren der infizierten Tiere (S-1 bis S-10) konnten perfekt von denen der gesunden Tiere (N-1 bis N-10) separiert werden.

Beispiel 3

In Abwandlung der in den Beispielen 1 und 2 dargestellten Ausführungsformen wurden von ZNS-Proben von N- und S-Tieren, die wie oben erläutert erhalten wurden, 8 µm dicke Kryodünnschnitte angefertigt und mit den an sich bekannten Verfahren des FT-IR Mappings (Diem et al. (1999) *Appl. Spectroscopy* 53: 148A-160A; Lasch & Naumann (1998) *Cell. Mol. Biol.* 44: 189-202; Choo et al. (1996) *Biophys. J.* 71: 1672-1679) und der Infrarotbildgebung (Lasch & Naumann (1998) *Cell. Mol. Biol.* 44:189-202; Lasch et al. (1998) *Proc. SPIE* 3257: 187-198) gemessen und charakterisiert. Es wurden Spektren von 1,5 mm X 1,5 mm großen Arealen in Schritten von 50 µm durch eine 60 µm Apertur

aufgenommen. Die von S- und N-Proben erhaltenen Spektren wurden dann jeweils zunächst getrennt einer hierarchischen Klassifizierung unterzogen, um eine Differenzierung der für verschiedene Hirnstrukturen typischen Spektren zu erzielen. Figur 4A zeigt ein Dendrogramm, für dessen Berechnung nach Datenkompression mittels Hauptkomponentenanalyse die ersten drei Hauptkomponenten zwischen 1450 und 950 cm^{-1} (ca. 500 Datenpunkte) benutzt wurden. Die vier Hauptklassen können den vier histologisch definierten cerebellaren Strukturen *Stratum moleculare*, *Stratum ganglionare*, *Stratum granulosum* und *Substantia alba* zugeordnet werden. Darüber hinaus konnten insgesamt neun spektrale Klassen separiert werden (numeriert: 1-9), die bestimmten Substrukturen innerhalb des Cerebellums entsprechen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Figur 4A nur jedes dritte Spektrum des insgesamt 930 Spektren enthaltenden Mapping-Datensatzes dargestellt.

Anschließend wurden Spektren einander entsprechender spektraler Klassen (z.B. Klasse 2 der Spektren von *Stratum moleculare* = graue Substanz des Kleinhirns) der N- und der S-Proben miteinander verglichen. Im oberen Teil von Figur 4B (a) sind vektornormierte zweite Ableitungen von Spektren von Proben Scrapie-infizierter Tiere (gestrichelte Linien) solchen von gesunden Tieren (durchgezogene Linien) gegenübergestellt. Im unteren Teil (b) sind die Differenzspektren zwischen vektornormierten S- und N-Spektren aus a) für die jeweiligen Gewebestrukturen dargestellt. Alle für diesen Vergleich verwendeten Spektren sind Mittelwerte von Spektren einer Spektralklasse (s. Figur 4A). Sie sind mit dem Namen ihrer cerebellaren Schicht und der Nummer ihrer spektralen Klasse gekennzeichnet. Die für die einzelnen Gewebeklassen beobachteten charakteristischen spektralen Unterschiede eignen sich für eine sichere Diagnose des krankheitsassoziierten Pathogeneseprozesses.

Patentansprüche

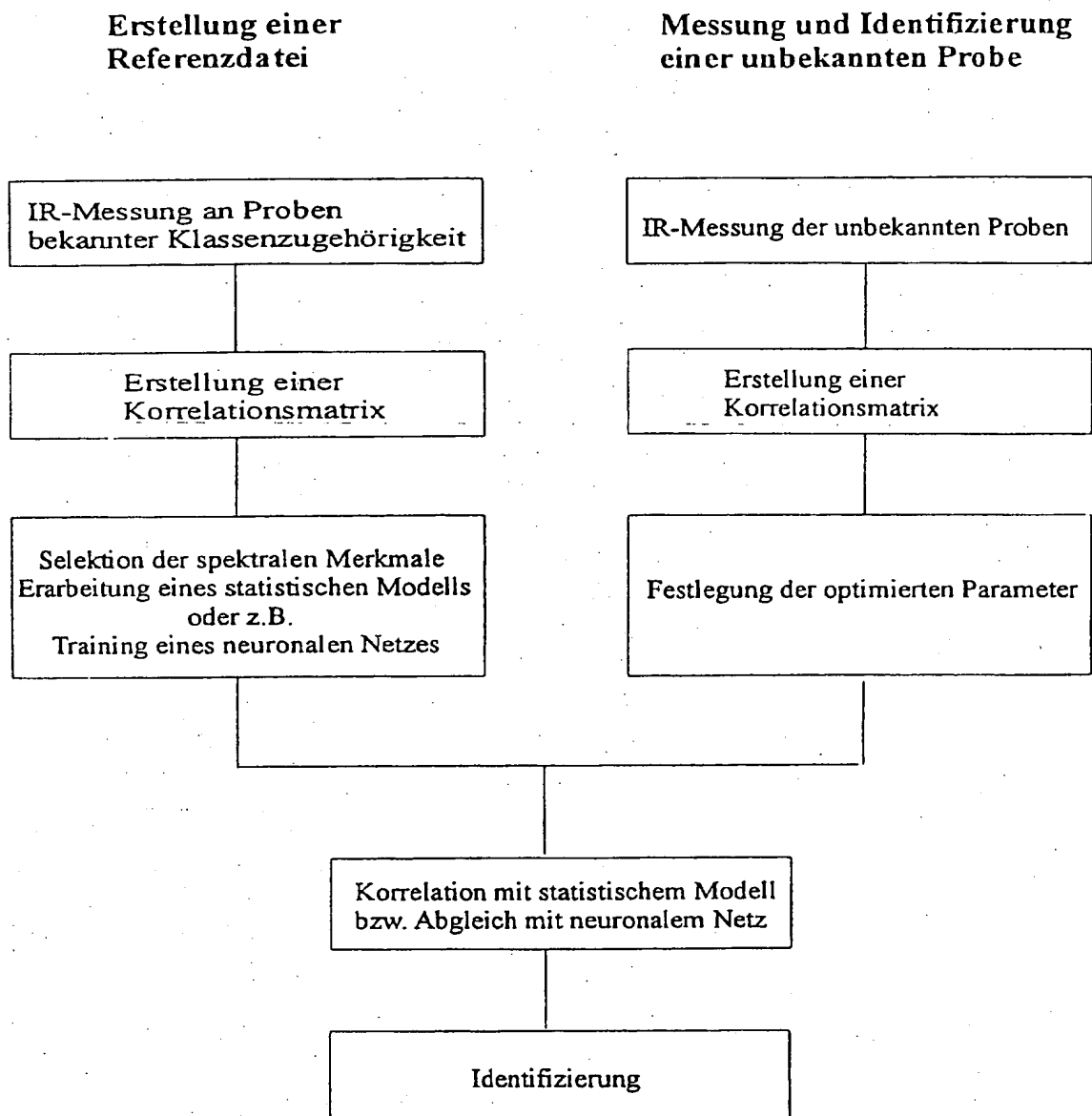
1. Verfahren zur Diagnose von TSE-induzierten pathologi-
5 schen Veränderungen in Geweben, wobei die Veränderun-
 gen durch Scrapie, BSE oder durch eine andere dem TSE-
 Formenkreis zugehörige Krankheitsform hervorgerufen
 werden, dadurch gekennzeichnet, daß
 (a) Infrarotstrahlung auf eine durch TSE pathologisch
10 veränderte Gewebeprobe gelenkt wird und die spektralen
 Charakteristika der Infrarotstrahlung nach Wechselwir-
 kung mit der Probe registriert werden und
 (b) die so erhaltenen Infrarotspektren mit einer Refe-
15 renzdatenbank, welche Infrarotspektren von TSE-
 infizierten Geweben und von nicht-infizierten Geweben
 enthält, verglichen und klassifiziert werden.
2. Verfahren nach Anspruche 1, dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Gewebeprobe dem zentralen Nervensystem, dem
 peripheren Nervensystem oder Organen des lymphatischen
 Systems, des Verdauungssystems, des endokrinen Sy-
 stems, des kardiovaskulären Systes oder des respirato-
 rischem Systems entstammt.
- 25 3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 und 2,
 dadurch gekennzeichnet, daß das Infrarotspektrum des
 Gewebes entweder in einer oder mehreren Regionen des
 mittleren Infrarotbereichs von 500 bis 4000 cm^{-1} oder
 des nahen Infrarotbereichs von 4000 bis 10000 cm^{-1}
30 oder in beiden Regionen gemessen wird.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3,
 dadurch gekennzeichnet, daß das Infrarotspektrum des
 Gewebes im spektralen Bereich von 1000 bis 1300 cm^{-1}

des mittleren Infrarots erfaßt wird.

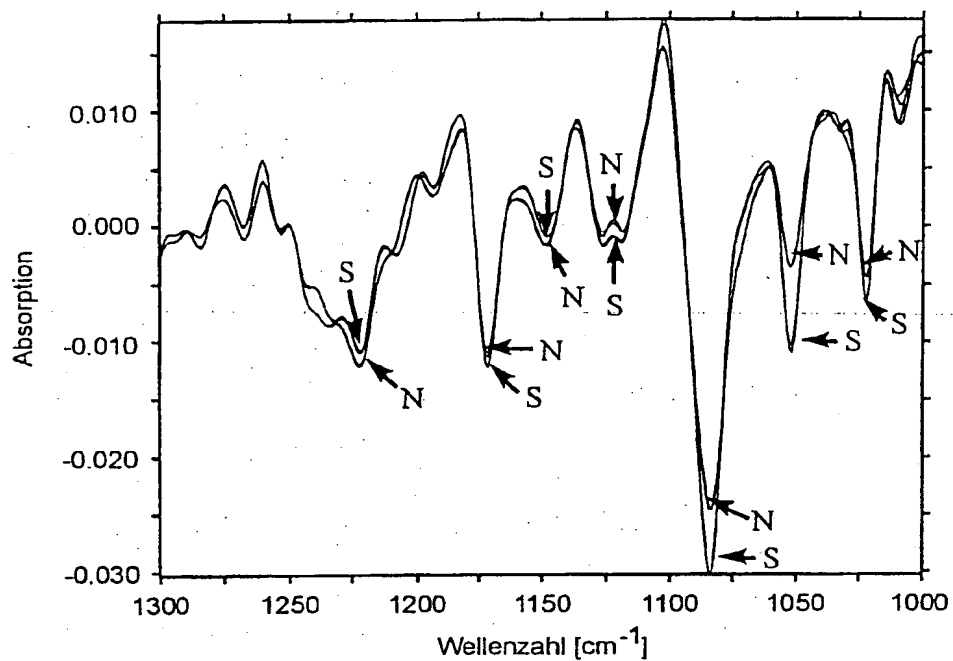
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die Wechselwirkung der In-
frarotstrahlung mit der Probe und die Detektion der
charakteristisch veränderten Strahlung in einer Trans-
missions/Absorptionsanordnung, einer Anordnung zur
Messung der abgeschwächten Totalreflexion, einer An-
ordnung zur Messung der direkten oder diffusen Refle-
xion oder mittels IR-Lichtleitertechnik erfolgt.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß der Vergleich des Infra-
rotspektrums der zu untersuchenden Probe mit den In-
frarotspektren der Referenzdatenbank mittels einer
oder mehrerer Methoden der Mustererkennung, vorzugs-
weise mittels Algorithmen der multivariaten Statistik
oder künstlicher neuronaler Netze, erfolgt, wobei die
dem Vergleich zugrundeliegenden spektralen Bereiche
mit Verfahren zur Extraktion optimaler spektraler
Merkmale, etwa mit genetischen Algorithmen, ermittelt
werden.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß die Messung des Infra-
rotspektrums mit einer infrarotmikroskopischen Meß-
anordnung an einem Gewebedünnschnitt in Transmission
oder in direkter Reflexion durchgeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß
orts aufgelöst, d.h. in Abhängigkeit von der Gewebe-
stelle, an welcher der Infrarotstrahl durch die Probe
geleitet wird, Infrarotspektren gemessen werden.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß jedes der ortsabhängig registrierten Infrarotspektren mit der Referenzdatenbank verglichen wird und somit ortsspezifische Informationen über die Krankheitsausbreitung im Gewebe erhalten werden.
- 5
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenzdatenbank Referenzspektren von TSE-infizierten Geweben und von nicht-infizierten Geweben jeweils aller im Gewebeschnitt mittels Infrarotspektroskopie unterscheidbarer Strukturen enthält.
- 10

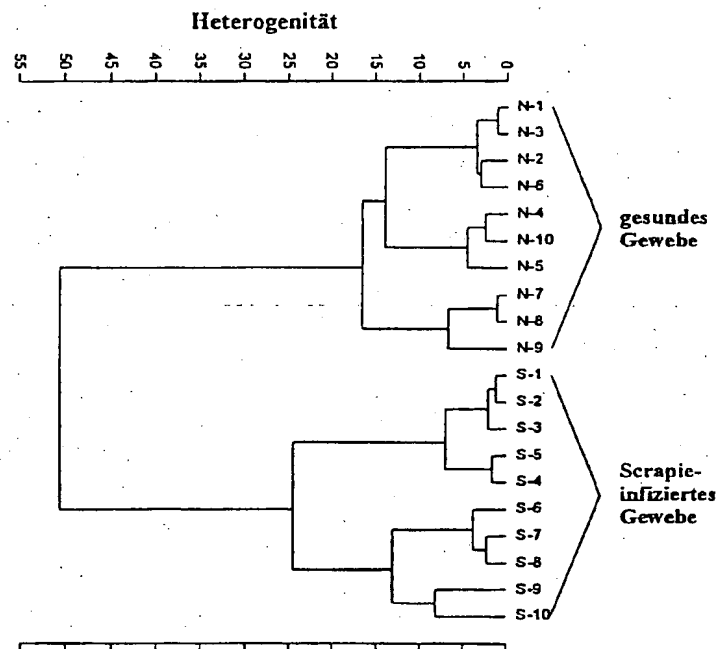
Figur 1



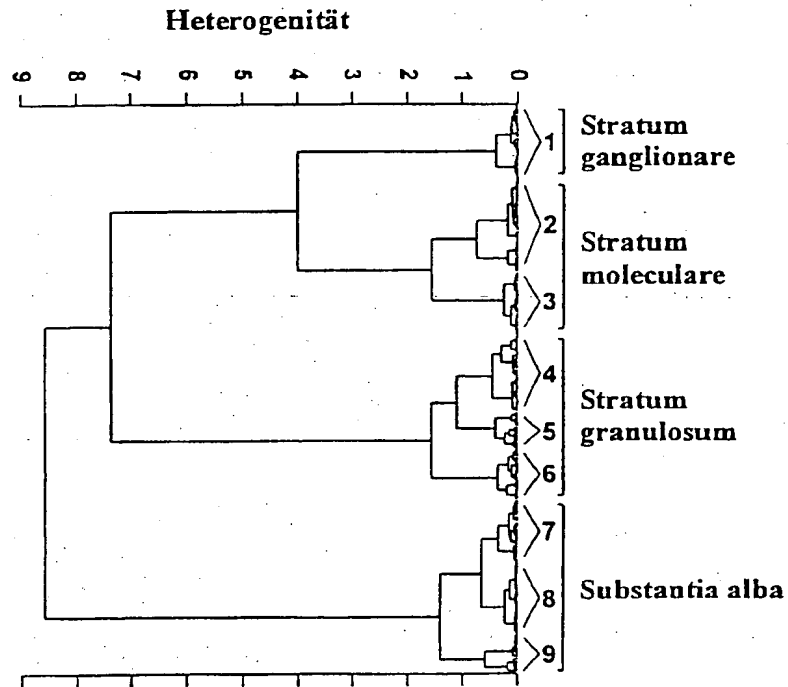
Figur 2



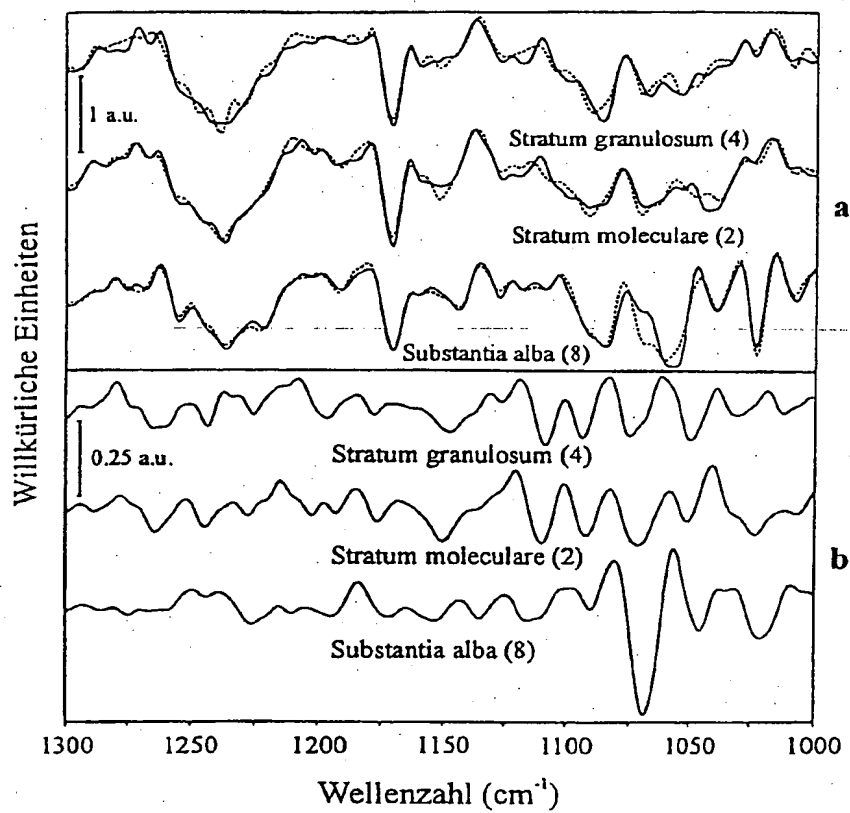
Figur 3



Figur 4A



Figur 4B



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. November 2000 (30.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/72007 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/487, 21/35

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ROBERT-KOCH-INSTITUT [DE/DE]; Nordufer 30, D-13353 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01404

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. Mai 2000 (03.05.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NAUMANN, Dieter [DE/DE]; Mariannenplatz 22, D-10997 Berlin (DE). KNEIPP, Janina [DE/DE]; Scharnweberstrasse 44, D-10247 Berlin (DE). BALDAUF, Elizabeth [DE/DE]; Bahnhofstrasse 45 C, D-14624 Dallgow (DE). LASCH, Peter [DE/DE]; Müggelstrasse 24, D-10247 Berlin (DE). BEEKES, Michael [DE/DE]; Bahnhofstrasse 45 C, D-14624 Dallgow (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

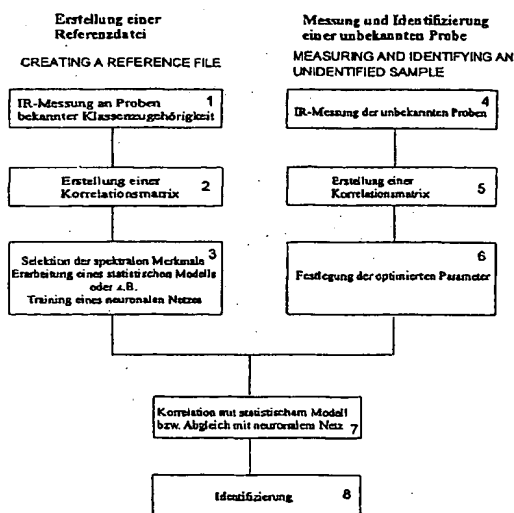
(30) Angaben zur Priorität:
199 23 811.1 20. Mai 1999 (20.05.1999) DE

(74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING TSE-INDUCED CHANGES IN TISSUES USING INFRARED SPECTROSCOPY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSE TSE-INDUZIERTER VERÄNDERUNGEN IN GEWEBEN MITTELS INFRAROTSPEKTROSKOPIE



- 1...IR MEASURING ON SAMPLES BELONGING TO KNOWN CLASSES
- 2...CREATING A CORRELATION MATRIX
- 3...SELECTING THE SPECTRAL CHARACTERISTICS
DEVELOPING A STATISTICAL MODEL OR e.g.
TRAINING A NEURONAL NETWORK
- 4...IR MEASURING THE UNIDENTIFIED SAMPLES
- 5...CREATING A CORRELATION MATRIX
- 6...DEFINING THE OPTIMAL PARAMETRES
- 7...CORRELATING WITH THE STATISTICAL MODEL
OR COMPARING WITH THE NEURONAL NETWORK
- 8...IDENTIFYING

(57) Abstract: The aim of the invention is to quickly diagnose TSE-induced changes in animal and human tissues by measuring infrared spectra of these tissues. Either thin slices of tissue, pieces of tissue or tissue homogenizates serve as tissue samples. The measurements of the infrared spectra are carried out in a known experimental device that is used in infrared spectroscopy (e.g. in transmission, attenuated total reflection, direct or diffuse reflection). The detection of the pathological changes induced by TSE is carried out by comparing the infrared spectra of the sample to be examined with a reference data bank consisting of infrared spectra that were obtained from healthy material or from pathologically changed tissue samples. The conformation of the spectra of unknown samples with the reference data bank is preferably carried out using pattern recognition techniques (e.g. multivariate statistical models, artificial neuronal networks, genetic algorithms).

(57) Zusammenfassung: Zur schnellen Diagnose TSE-induzierter Veränderungen in tierischen und menschlichen Geweben werden Infrarotspektren dieser Gewebe gemessen. Als Gewebeprobe dienen entweder Gewebedünnschnitte, Gewebestücke oder Gewebekomponenten. Die Messungen der Infrarotspektren erfolgen in einer an sich bekannten experimentellen Anordnung der IR-Spektroskopie (z.B. in Transmission, abgeschwächter Totalreflexion, direkter oder diffuser Reflexion). Der Nachweis der durch TSE hervorgerufenen pathologischen Veränderungen erfolgt dann über einen Vergleich der Infrarotspektren der zu untersuchenden Probe mit einer Referenzdatenbank, bestehend aus Infrarotspektren, die von gesundem Material bzw. von pathologisch veränderten Gewebeproben erhalten wurden. Der Abgleich der Spektren unbekannter Proben mit der Referenzdatenbank erfolgt bevorzugt mittels Mustererkennungstechniken (z.B. multivariater statistischer Modelle, künstlicher neuronaler Netze, genetischer Algorithmen).

WO 00/72007 A3



(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

26. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/487 G01N21/35

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAUGHEY B W ET AL.: "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy" BIOCHEMISTRY, no. 30, 6 August 1991 (1991-08-06), pages 7672-7680, XP000926037	1-5
Y	page 7672, left-hand column, line 1 -right-hand column, line 10 page 7673, right-hand column, line 37 - line 63 --- -/-	6-8, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2000

Date of mailing of the international search report

22/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Navas Montero, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/DE 00/01404

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOODACRE R ET AL.: "Rapid identification of Streptococcus and Enterococcus species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 140, 1996, pages 233-239, XP000926039 page 234, left-hand column, line 18 - line 29 page 233, right-hand column, line 12 -page 234, left-hand column, line 4	6
Y	DE 198 41 217 A (ACSPECT CORP) 29 April 1999 (1999-04-29) column 9, line 28 - line 52 column 7, line 36 - line 63 column 5, line 13 - line 25 column 4, line 22 - line 35	7,8,10
T	KNEIPP J ET AL.: "Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA , vol. 1501, 2000, pages 189-199, XP000926044 the whole document	1-9
A	US 5 734 587 A (MISCHLER REINHARD ET AL) 31 March 1998 (1998-03-31) column 7, line 47 - line 57; figure 2 column 4, line 48 - line 67 column 1, line 4 - line 12	1,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01404

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19841217	A	29-04-1999	NONE	
US 5734587	A	31-03-1998	DE 4331596 A	23-03-1995
			DE 4415253 A	02-11-1995
			EP 0644412 A	22-03-1995
			EP 0644413 A	22-03-1995
			JP 2989496 B	13-12-1999
			JP 7167779 A	04-07-1995
			JP 3017920 B	13-03-2000
			JP 7167782 A	04-07-1995
			US 5605838 A	25-02-1997
			US 5869001 A	09-02-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01404

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPC 7 G01N33/487 G01N21/35

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPC 7 G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CAUGHEY B W ET AL.: "Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy" BIOCHEMISTRY, Nr. 30, 6. August 1991 (06.08.91), seiten 7672-7680, XP000926037	1-5
Y	seite 7672, linke spalte, zeile 1 -rechtespalte, zeile 10 seite 7673, rechte spalte, zeile 37 - zeile 63	6-8, 10
	— — — — — -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2000 (13.11.00)

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22. November 2000 (22.11.00)

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt

Bevollmächtigter Bediensteter

Telefaxnr.

Telefonnr.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01404

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>GOODACRE R ET AL.: "Rapid identification of Streptococcus and Enterococcus species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, Band 140, 1996, seitenj233-239, XP000926039 seite 234, linke spalte, zeile 18 - zeile 29 seite 233, rechte spalte, zeile 12 - zeile 234, linke spalte, zeile 4</p>	6
Y	<p>DE 198 41 217 A (ACSPECT CORP) 29. April 1999 (29.04.99) spalte 9, zeile 28 - zeile 52 spalte 7, zeile 36 - zeile 63 spalte 5, zeile 13 - zeile 25 spalte 4, zeile 22 - zeile 25</p>	7,8,10
T	<p>KNEIPP J ET AL.: "Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA , Band 1501, 2000, zeilen 189 - 199, XP000926044, siehe die ganze dokument</p>	1-9
A	<p>US 5 734 587 A (MISCHLER REINHARD ET AL) 31. März 1998 (31.03.98) spalte 7, zeile 47 - zeile 57; figur 2 spalte 4, zeile 48 - zeile 67 spalte 1, zeile 4 - zeile 12</p>	1,9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01404

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19841217 A	29-04-1999		
US 5734587 A	31-03-1998	DE 4331596 A	23-03-1995
		DE 4415253 A	02-11-1995
		EP 0644412 A	22-03-1995
		EP 0644413 A	22-03-1995
		JP 2989496 B	13-12-1999
		JP 7167779 A	04-07-1995
		JP 3017920 B	13-03-2000
		JP 7167782 A	04-07-1995
		US 5605838 A	25-02-1997
		US 5869001 A	09-02-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.